

COMPUESTOS INMUNORREACTIVOS, ANTICUERPOS OBTENIDOS, BIOSENSORES E INMUNOENSAYOS PARA DETECTAR ANTIBIÓTICOS TIPO COLISTINA

5

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un compuesto para monitoreo de medicamentos antibióticos, más particularmente para detectar y cuantificar la presencia de antibióticos de última
10 generación empleados para tratar infecciones por bacterias multirresistentes, aún más particularmente, para detectar y cuantificar la presencia de antibiótico tipo colistina en tejidos y fluidos de animales, incluido humanos, que han sido tratados con estos antibióticos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15

La resistencia a los antibióticos representa una de las amenazas más dramáticas para la salud pública mundial. El aumento de las bacterias multirresistentes, que podría estarse dando principalmente por la prescripción excesiva de antibióticos en humanos y, especialmente, al uso excesivo en animales domésticos (incluida la prescripción profiláctica), pone de manifiesto la
20 necesidad de moderar el uso de tratamientos de último recurso. Un informe reciente de la Agencia Europea de Medicamentos (2013) recomienda una terapia antimicrobiana racional que incluya el cese de su uso en el control y tratamiento de *Salmonella spp.* en aves de corral y cerdos, y en la mejora de la producción, por ejemplo, el aumento de la eficiencia alimentaria o la promoción del crecimiento. Además, la Agencia Europea para la Evaluación de Medicamentos
25 (2002) y la Comisión del *Codex Alimentarius* han establecido el límite máximo de residuos de antibióticos.

Más del 70% de las bacterias son resistentes a todos o casi todos los antimicrobianos conocidos, lo que crea la necesidad de desarrollar nuevos tipos de antimicrobianos o el uso de terapias
30 antimicrobianas de "última línea" para el tratamiento de bacterias multirresistentes. Debido a la toxicidad de este tipo de moléculas, es necesario desarrollar nuevas metodologías rápidas para ser utilizadas en la Monitorización Terapéutica de Fármacos (TDM, por sus siglas en inglés). La

TDM podría mejorar los resultados de los pacientes y reducir los costos de atención médica al permitir un resultado clínico favorable. Para este seguimiento se utilizan diversas técnicas, como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), la cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) y los inmunoensayos (Yamin, *et.al*, 2023).

5

La resistencia a los antimicrobianos (RAM), debido al uso inadecuado y excesivo de agentes antibióticos tanto en el ámbito clínico como en el veterinario, ha provocado un aumento de las mutaciones genéticas de las bacterias y su transferencia horizontal. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estima que, en 2050, las infecciones causadas por bacterias
10 resistentes a los antibióticos podrían causar la muerte de 10 millones de personas en todo el mundo cada año. Esto ha llevado a la necesidad de implementar una serie de medidas para minimizar el impacto, como prescribir y dispensar antibióticos solo cuando sea necesario o evitar infecciones mediante la capacitación y garantizar la limpieza de manos, instrumental y medio ambiente. Sin embargo, las medidas para reducir el aumento de las infecciones por RAM no han
15 sido suficientes. El aumento de las bacterias de la resistencia a los antimicrobianos ha requerido el desarrollo de nuevos tipos de antibióticos o el uso de terapias antibióticas con fármacos de "última línea" altamente tóxicos.

Debido a lo anterior, se hizo necesario el monitoreo terapéutico de fármacos (TDM), una
20 herramienta de importancia clínica definida como la individualización de la dosis de un fármaco, manteniendo las concentraciones del fármaco en órganos o fluidos corporales (sangre, plasma, orina, entre otros) dentro de un rango objetivo. Este seguimiento se lleva a cabo mediante diferentes técnicas, entre las que se incluyen la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-MS/MS), (HPLC-UV), la cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS), los
25 inmunoensayos y los biosensores (Kao, *et.al*, 2025). Los inmunoensayos son uno de los más utilizados y se basan en la unión antígeno-anticuerpo (inmunocomplejo) para la detección de analitos en diferentes muestras. Los principales inmunoensayos utilizados en TDM son los radioinmunoensayos (RIA), los fluoroinmunoensayos (FPIA) y los ensayos de inmunoabsorción enzimática (ELISA), a los que se ha permitido la cuantificación de antibióticos, anticancerígenos
30 y fármacos biológicos.

Entre este tipo de antibióticos está la colistina, también conocida como polimixina E, es un antibiótico perteneciente a la familia de las polimixinas, un grupo de antimicrobianos polipeptídicos cíclicos con actividad bactericida frente a bacterias gramnegativas. Su estructura química consiste en un decapeptido cíclico unido a una cadena lateral lipofílica derivada de un ácido graso, lo que le confiere propiedades anfipáticas que facilitan su interacción con componentes lipídicos de la membrana bacteriana (Falagas et al., 2005). Esta afinidad estructural, especialmente hacia el lipopolisacárido (LPS) de la membrana externa, permite su acción antimicrobiana. Debido a su toxicidad, en particular nefrotoxicidad y neurotoxicidad, la colistina se ha reservado como tratamiento de último recurso frente a infecciones graves causadas por bacterias gramnegativas multirresistentes como *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y *Klebsiella pneumoniae* (Nation & Li, 2009).

El mecanismo de acción de la colistina se basa en su unión al LPS mediante interacciones electrostáticas, desplazando cationes divalentes como Mg^{2+} y Ca^{2+} que estabilizan la membrana externa, lo cual induce una alteración en la integridad de la bicapa lipídica y aumenta la permeabilidad celular (Poirel et al., 2017). Esta disrupción provoca la fuga de componentes intracelulares y conduce a la lisis celular, ejerciendo así una acción bactericida rápida. A diferencia de otros antibióticos que actúan sobre blancos intracelulares, la colistina actúa directamente sobre la estructura de la membrana. No obstante, en los últimos años se ha reportado un incremento preocupante de resistencia a colistina, mediada por modificaciones del LPS, particularmente mediante la adquisición de genes plasmídicos como *mcr-1* (Liu et al., 2016), lo cual representa una amenaza para el control de infecciones hospitalarias por bacterias multirresistentes.

Algunos documentos enseñan el uso de inmunoensayos dirigidos a detectar estos antibióticos:

Algunos estudios científicos han desarrollado y caracterizado anticuerpos específicos para detectar colistina (polimixina E) mediante ensayos tipo ELISA. El trabajo de Garzón, et.al. (2024) describe el desarrollo de anticuerpos policlonales específicos capaces de reconocer con gran precisión las moléculas de colistina y otros antibióticos como vancomicina o daptomicina. Estos anticuerpos mostraron una buena capacidad de detección (IC_{50} de 7,56 nM para

colistina”) en matrices como plasma humano, lo que sugiere su utilidad potencial en el monitoreo terapéutico PMC.

De manera similar, el artículo de Galvidisa, *et.al.* (2020) presenta el desarrollo de un ELISA competitivo indirecto específico para colistina en productos como leche y huevos. Dado que las polimixinas son compuestos de bajo peso molecular (900–1300 Da) que no inducen respuesta inmune por sí mismos, se usaron conjugados hapteno-proteína para generar anticuerpos. El ensayo optimizado alcanzó un IC_{50} de 5 ng/mL, amplio rango de medición (1.0–80 ng/mL) y un límite de detección notablemente bajo (IC_{10} = 0,4 ng/mL).

El documento US20190322727 describe el desarrollo de anticuerpos (tanto policlonales como monoclonales) específicos para las proteínas de resistencia MCR-1 y MCR-2. Un ELISA tipo “sandwich” basado en estos anticuerpos logró detectar concentraciones tan bajas como 0,01 ng/mL de proteína MCR, incluso en carne contaminada con menos de 10^2 UFC de bacterias resistentes en 25 g de muestra-

Por su parte, la solicitud de patente US20160097784 divulga métodos para detectar polimixinas (colistina y polimixina B) mediante anticuerpos—policlonales o monoclonales—. También se menciona el dispositivo para detección basado en soporte sólido recubierto con dichos anticuerpos.

El documento US12203124 proporciona pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de tipo pruebas rápidas de muestras clínicas para un análisis eficiente y versátil y resultados confiables. Estas pruebas utilizan compuestos complejos que pueden generar anticuerpos y con ellos, hacer detección de antibióticos en el sistema del organismo.

A pesar del avance en tecnologías inmunológicas, persiste la necesidad de herramientas rápidas, sensibles y específicas para detectar antibiótico colistina o sus enzimas degradativas en matrices biológicas. El desarrollo de anticuerpos alternativos de alta especificidad dirigidos a antibióticos tipo colistina constituye una valiosa contribución. Además, combinar estos anticuerpos con plataformas de detección portátiles (p.ej., biosensores, inmunoensayos tipo “dipstick”) podría facilitar diagnósticos en campo o entorno clínico inmediato.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Esta solicitud brinda solución a este problema técnico al desarrollar y caracterizar compuestos inmunorreactivos específicos para el reconocimiento de antibióticos tipo colistina, para el seguimiento de estos antibióticos en diferentes muestras, tejidos o fluidos animales, como el plasma animal, incluido el humano. Estos compuestos ofrecen una herramienta prometedora para el seguimiento terapéutico preciso y eficaz de antibióticos críticos, lo que podría mejorar la eficacia del tratamiento y la seguridad del paciente.

5

La presente invención se refiere a un compuesto inmunorreactivo de fórmula (I) conformado por un antibiótico de tipo colistina y un soporte inmunogénico. Este compuesto inmunorreactivo genera anticuerpos dirigidos a este tipo de antibiótico.

10

La invención también se refiere al proceso de elaboración del compuesto de fórmula (I) y al proceso de obtención de anticuerpos policlonales empleando este compuesto.

Un objeto de la invención es un biosensor para detectar antibiótico de tipo colistina, en muestras de cualquier tipo. El biosensor puede ser electroquímico u óptico, y comprende:

15

- a) un elemento transductor (electroquímico o SPR),
- b) una superficie de detección funcionalizada con un compuesto de fórmula (I),
- c) un anticuerpo específico policlonal,
- d) y reactivos enzimáticos o de detección óptica, según el caso.

20

Otro objeto de la invención es un kit para la detección y/o cuantificación del antibiótico tipo colistina, que comprende al menos un anticuerpo o un compuesto de fórmula (I) según se ha descrito anteriormente, recipientes y/o soportes para colocar el inmunorreactivo.

25

La presente invención también se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I), su uso en la obtención de anticuerpos policlonales específicos para colistina y para la fabricación de biosensores electroquímicos y ópticos para detectar colistina en muestras, tejidos de origen animal, preferiblemente humano.

30

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Títulos de los antisueros COL-DMP-BSA. Las placas se recubrieron a 1 μ /mL de bioconjugado competidor y los antisueros se diluyeron 64 000 veces. El título de los anticuerpos para cada uno de los antibióticos fue aumentando a lo largo del tiempo de inmunización.

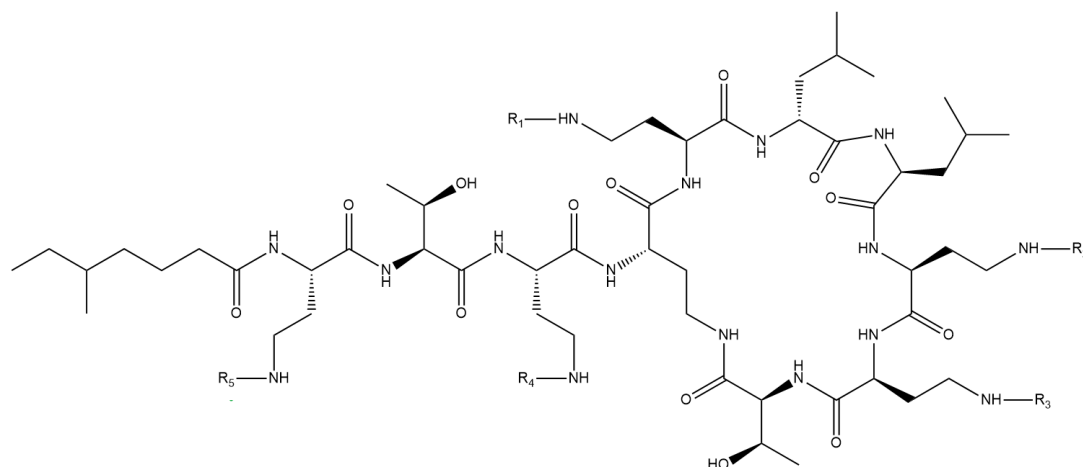
Figura 2. Evaluación de las combinaciones óptimas de inmunorreactivos en un ensayo de competencia indirecta por su capacidad para reconocer su antibiótico analito correspondiente. Las curvas permiten observar que existe una competencia.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un conjunto de inmunorreactivos del antibiótico colistina. De igual modo se refiere a los inmunorreactivos resultantes de la unión del antibiótico colistina a soportes inmunogénicos y al uso de estos en la obtención de anticuerpos con selectividad para el antibiótico colistina. A su vez se refiere a la utilización de alguno de dichos inmunorreactivos, a modo de inmunorreactivos secundarios, y de los anticuerpos generados a partir de ellos, en métodos inmunoquímicos de análisis y biosensores en muestras biológicas.

Compuesto inmunorreactivo

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I) para la molécula de colistina:



(I)

o sus sales, isómeros o solvatos,

Donde

R₁, R₂, R₃, R₄ y R₅ se seleccionan entre H, HR₆ o HR₇R₆;

- 5 R₆ es un soporte inmunogénico que se selecciona entre albúmina de suero bovino (BSA), ovalbúmina, peroxidasa de rábano picante (HRP), hemocianina de lapa ojo de cerradura (KLH) o hemocianina de cangrejo herradura (HCH);

R₇ es un agente reticulador se selecciona entre dimetil suberimidato dihidrocloruro (DMS·2HCl); C₁₃H₂₆N₂O₄·2HCl, C₁₄H₂₈N₂O₄·2HCl, dimetil pimelimidato dihidrocloruro (DMP·2HCl); C₁₂H₂₄N₂O₄·2HCl, o dimetil adipimidato dihidrocloruro (DMA·2HCl);

- 10

donde R₆ siempre está presente en uno de R₁, R₂, R₃, R₄ o R₅; y

donde cuando está R₇ está unido a R₆.

Tal como se emplea en la presente invención, “soporte inmunogénico” se refiere a aquellos
15 materiales con la propiedad de generar con independencia una respuesta inmune en el animal huésped y que pueden estar unidos mediante enlace covalente a los haptenos descritos en la presente invención. El material soporte idóneo incluye, por ejemplo, compuestos poliméricos naturales o sintéticos, como por ejemplo polipéptidos, oligonucleótidos, también incluye proteínas, como, por ejemplo, albúminas, seroproteínas, globulinas, lipoproteínas,
20 hemocianinas. Ejemplos ilustrativos de soporte inmunogénico incluyen seroproteína bovina, ovalbúmina, hemocianina de lapa ojo de cerradura, hemocianina de cangrejo herradura.

El término “agente reticulador” se refiere a un agente que estimula la estabilidad en la unión del antibiótico y el soporte inmunógeno. Para el presente caso, se trata de un compuesto bifuncional
25 o multifuncional que puede formar enlaces covalentes entre un hapteno y una proteína portadora, o entre una proteína y un soporte sólido. Algunos ejemplos de posibles compuestos de agentes reticuladores son: C₁₄H₂₈N₂O₄·2HCl, dimetil suberimidato dihidrocloruro (DMS·2HCl); C₁₃H₂₆N₂O₄·2HCl, dimetil pimelimidato dihidrocloruro (DMP·2HCl); C₁₂H₂₄N₂O₄·2HCl, dimetil adipimidato dihidrocloruro (DMA·2HCl) y compuestos conocidos
30 en el estado de la técnica que realicen esta función.

Por su parte, la expresión “inmunorreactivos secundarios” se refiere a aquellos reactivos necesarios en un inmunoensayo de competencia para la detección de moléculas de bajo peso molecular. Pueden ser antígenos de tapizado, los cuales se emplean en inmunoensayos de competencia en formato indirecto y en cuyo caso se unen al soporte sólido y compiten con el analito por el anticuerpo en disolución. Pueden ser trazadores, bien enzimáticos, fluorescentes, los cuales se emplean en inmunoensayos de competencia y en cuyo caso compiten en disolución con el analito por el anticuerpo inmovilizado sobre el soporte sólido.

Teniendo en cuenta que los compuestos de fórmula (I) poseen grupos y átomos susceptibles de perder o ganar cargas, la presente invención también se refiere a un compuesto de fórmula (I) en forma de sal.

Los compuestos de la presente invención representados por la fórmula (I), y más concretamente, los compuestos específicos pertenecientes a esta fórmula general anteriormente descrita pueden incluir isómeros, dependiendo de la presencia de enlaces múltiples (por ejemplo, Z, E), incluyendo isómeros ópticos o enantiómeros, dependiendo de la presencia de centros quirales. Los isómeros, enantiómeros o diastereoisómeros individuales y las mezclas de estos caen dentro del alcance de la presente invención. Los enantiómeros o diastereoisómeros individuales, así como sus mezclas, pueden separarse mediante técnicas convencionales.

De otra parte, el proceso de formación del compuesto inmunorreactivo de fórmula (I) se realiza al:

- a) activar un soporte inmunogénico con un compuesto de unión bifuncional;
- b) conjugar el soporte inmunogénico activado en (a) con un compuesto antibiótico tipo colistina.

La activación del soporte inmunogénico se puede realizar mediante cualquier técnica bioquímica conocida, aunque en el procedimiento de la presente invención preferiblemente se realiza haciendo reaccionar el soporte inmunogénico con ésteres de succinimida o agentes reticulantes con grupos imidoéster.

Particularmente, agentes reticulantes pueden ser cloruro cianúrico, bis-Imidoésteres, bis-N-Succinimidil, diisocianatos o diisotiocianatos, biacilazidas, 5 dihaldehidos, dicetonas o cualquier compuesto susceptible de reaccionar con varios grupos amina por etapas, así como sus mezclas.

- 5 Este proceso permite obtener compuestos de fórmula (I) con uniones soporte inmunógeno y compuesto antibiótico en diferentes grupos funcionales de la molécula de colistina, lo que da lugar a diferentes conformaciones de radicales con o sin sustitución. Aunque los compuestos de fórmula (I) se puede formar con uniones potenciales en diferentes lugares de su estructura química, solo hay un punto de conjugación entre la molécula de antibiótico y el soporte
- 10 inmunogénico por cada compuesto de fórmula (I). De allí, que el proceso permita obtener mezclas de diferentes tipos de compuestos de fórmula (I).

Producción de compuestos de fórmula (I)

- 15 Producción de los compuestos de fórmula (I) se dividió en dos partes, una centrada en la producción de los inmunógenos usados para la producción de anticuerpos y la segunda basada en la preparación de antígenos de tapizado (inmunorrectivos secundarios) para los ensayos de ELISA y los biosensores.
- 20 La primera etapa de la producción de anticuerpos policlonales corresponde a la síntesis del inmunógeno, donde se tuvieron en cuenta las características deseadas para el inmuno-ensayo final, teniendo en cuenta la composición y estructura química del antibiótico y las proteínas de conjugación. Para la preparación de los inmunógenos se consideró la estructura química de la colistina para determinar los métodos de conjugación. La colistina fue acoplada a las proteínas
- 25 de la albumina de suero fetal bovino (BSA) y hemocianina de herradura de cangrejo (HCH) por el método de éster activo utilizando EDC como carbodiimida.

- Para la conjugación se disolvieron 10 mg de las proteínas (BSA o HCH) en PBS 0,01 M; seguido de la adición de una solución de antibiótico 10 μ mol en PBS 0,01 M (100 μ l). Posteriormente, se
- 30 adiciono una solución de NHS (18 μ mol) seguido de la incorporación gota a gota de EDC (18 μ mol), ambas soluciones preparadas en PBS 0,01 M (100 μ l). El pH de la solución final se ajustó

a 9 y las mezclas se agitaron durante la noche a temperatura ambiente (TA), para favorecer la reacción.

5 Los conjugados antibiótico-proteína obtenidos se purificaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño utilizando una columna HiTrap desalting Sephadex G-25 Superfine (Amersham Biosciences) utilizando agua ultrapura como eluyente y se almacenaron liofilizados a -80 °C. Las alícuotas de trabajo se almacenaron a 4 °C en PBS 0,01 M a 1 mg/ml.

10 Para la preparación de compuestos de fórmula (I) como inmunorreactivos secundarios se utilizó la vía de agente reticulador. Para la conjugación, se prepararon dos soluciones: a) una solución de clorhidrato de dimetilpimelimidato (DMP 2HCl, 0,16 mg) en tampón borato 0,2 M (66 µL) y b) una solución de colistina (0,33 mg) en agua ultrapura (100 µL) ambas en baño de hielo. A continuación, se mezclaron ambas disoluciones y dicha mezcla se añadió gota a gota a una solución de Proteína (2 mg) en tampón de bórax/borato 0,2 M (500 µL) sumergida en hielo, 15 manteniendo en agitación durante 10 min y 60 min a temperatura ambiente. La reacción se detuvo añadiendo base Tris (20 mM) en tampón de borato 0,2 M (134 µL).

Se purificó el conjugado de la proteína mediante diálisis frente a PBS 0,5 mM (4 x 5 l) y agua milliQ (1 x 5 l) y se liofilizó.

20

Utilizando dicha metodología se obtiene el siguiente compuesto de fórmula (I) COL-DMP-BSA.

Análisis de densidad de hapteno

25 Las densidades de hapteno de los bioconjugados se calcularon mediante MALDI-TOF-MS comparando el peso molecular de las proteínas nativas (BSA) con el de los bioconjugados. Los espectros MALDI se obtuvieron mezclando 2 µL de la matriz recién preparada (ácido sinapínico, 10 mg mL⁻¹ en ACN, TFA al 0,1 %) con 2 µL de una solución de los conjugados de BSA en ACN/H₂O 50:50, TFA al 0,1 %. (5mg/mL). La densidad de hapteno (δ hapteno) se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

30

$$[\text{MW}(\text{Conjugado}) - \text{MW}(\text{Proteína})] / \text{MW}(\text{Hapteno}).$$

“Agentes reticulantes” se refiere a aquellos compuestos con dos grupos funcionales, generalmente en extremos opuestos de la molécula, capaces de reaccionar con otros grupos funcionales incorporados bien a los haptenos o bien a los soportes inmunogénicos. Si los grupos funcionales con los que deben reaccionar son idénticos, son compuestos de unión homobifuncional y si los grupos con los que deben reaccionar son diferentes, son compuestos de unión heterobifuncional”.

Algunos ejemplos de agentes reticulantes pueden ser: disuccinimidil suberato (DSS), bis(imidoéster) de dimetil suberimidato (DMS), disuccinimidil glutarato (DSG), Succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), N-(γ -Maleimidobutirilo) succinimida éster (GMBS), sulfo-SMCC, imidoésteres, carbodiimida o cualquier otro activador de la reactividad de ácidos carboxílicos, bien procedan del hapteno o del soporte inmunogénico y otros compuestos con esta función conocidos en el estado de la técnica, así como sus mezclas.

Producción de anticuerpos

En un segundo aspecto la presente invención, los compuestos inmunorreactivos descritos en la presente invención pueden utilizarse para generar anticuerpos, tanto policlonales como monoclonales, mediante procedimientos bien establecidos en la técnica. Usualmente, el inmunógeno se inoculara a un animal huésped como conejo, ratón, cabra, cobayo o caballo, acompañado de un adyuvante. Luego se realizan refuerzos inmunológicos en el mismo o en diferentes sitios, en intervalos variables, mientras se monitorea la producción de anticuerpos mediante extracciones sanguíneas periódicas.

Una vez alcanzado un título óptimo de anticuerpos, estos pueden obtenerse por sangrado del animal para recolectar antisuero, o mediante técnicas como la hibridación de células somáticas para producir anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos obtenidos pueden conservarse a bajas temperaturas, por ejemplo, a -20°C , para su posterior uso en aplicaciones diagnósticas o terapéuticas.

El término "anticuerpos", tal como se utiliza en esta descripción, incluye no solo inmunoglobulinas completas, sino también fragmentos con capacidad de unión al antígeno, los

cuales pueden producirse mediante técnicas conocidas, tales como los fragmentos Fab, F(ab') y Fv.

5 Asimismo, el método preferido de la invención utiliza anticuerpos que no se unen a metabolitos no deseados. Además, estos anticuerpos se unen a sitios no peptídicos de antibióticos tipo colistina.

Estos anticuerpos pueden ser marcados con etiquetas que faciliten su identificación y localización, tal como moléculas con fluorescencia o quimioluminiscencia.

10

Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de obtención de anticuerpo contra el antibiótico colistina que comprende:

- a) preparar una composición entre el compuesto inmunorreactivo de fórmula (1), y un adyuvante apropiado;
- 15 b) inmunizar un animal no humano con el conjugado;
- c) extraer los anticuerpos generados en (b).

20 El soporte inmunogénico puede ser cualquier polímero sintético o natural, oligonucleótido, polipéptido o proteína para conjugación de haptenos conocida en el estado de la técnica, aunque preferiblemente se selecciona entre las proteínas seroalbúmina bovina, ovoalbúmina, peroxidasa de rábano picante, hemocianina de lapa ojo de cerradura, hemocianina de cangrejo herradura.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un anticuerpo obtenible por el procedimiento según se ha descrito.

25

En un aspecto, la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I) según se ha descrito anteriormente para la obtención de anticuerpos de amplio espectro contra el antibiótico colistina.

30 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de los anticuerpos descritos para la detección y/o cuantificación del antibiótico colistina en una muestra biológica aislada. Preferiblemente esta muestra biológica procede de origen humano y más preferiblemente son

muestras de plasma sanguíneo. Esta muestra también puede ser no-biológica, por ejemplo muestra de suelos, residuos, líquidos, plantas, microorganismos, alimentos, materia prima de cualquier origen y cualquier otro tipo de muestra.

- 5 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso como inmunoreactivos secundarios de los compuestos de fórmula (I) descritos, en la detección y/o cuantificación del antibiótico colistina en una muestra biológica aislada. Preferiblemente esta muestra biológica procede de origen humano y más preferiblemente son muestras de plasma sanguíneo.
- 10 “inmunoreactivos secundarios” se refiere a aquellos reactivos necesarios en un inmunoensayo de competencia para la detección de moléculas de bajo peso molecular. Pueden ser antígenos de tapizado, los cuales se emplean en inmunoensayos de competencia en formato indirecto y en cuyo caso se unen al soporte sólido y compiten con el analito por el anticuerpo en disolución. Pueden ser trazadores, bien enzimáticos, fluorescentes, radioactivos..., los cuales se emplean en
- 15 inmunoensayos de competencia en formato directo y en cuyo caso compiten en disolución con el analito por el anticuerpo inmovilizado sobre el soporte sólido.

En este caso, el proceso para detección y cuantificación de antibióticos tipo colistina en una muestra tiene los siguientes pasos:

- 20 a. poner en contacto la muestra con:
- i. un reactivo de anticuerpo que comprende anticuerpos capaces de unirse específicamente a antibióticos tipo colistina producidos con un inmunorreactivo de fórmula (I);
 - ii. compuesto inmunorreactivo de fórmula (I), unido a un soporte o
- 25 marcado con una etiqueta
- b. medir la cantidad del reactivo marcador en una solución de reacción que se une o no al anticuerpo en función de la cantidad de antibiótico tipo colistina en la muestra de prueba;
- 30 donde la solución de reacción contiene un anticuerpo capaz de unirse específicamente a antibióticos tipo colistina, producidos con un inmunógeno de fórmula (I) y un compuesto inmunorreactivo de fórmula (I), que actúa como inmunoreactivo secundario

Biosensor para la cuantificación de antibióticos tipo colistina, en muestras biológicas.

5 Otra modalidad de la presente invención se refiere a un biosensor inmunoquímico o inmunosensor diseñado para la cuantificación de antibióticos con margen terapéutico estrecho, particularmente colistina, en muestras de cualquier tipo. Preferiblemente, pueden ser muestras biológicas, más preferiblemente muestras de origen humano, por ejemplo, plasma humano.

10 El biosensor puede operar bajo dos modalidades de transducción: electroquímica y óptica, utilizando inmunorreacción específica entre el antibiótico y un anticuerpo policlonal desarrollado a partir de un compuesto inmunorreactivo de fórmula I como el de la invención. Ambas modalidades permiten la monitorización terapéutica en tiempo real, con alta sensibilidad y especificidad, siendo aptas para aplicaciones clínicas portátiles o de laboratorio.

15 Entonces, las modalidades del biosensor son de preferencia:

- Modalidad electroquímica de biosensor (amperométrica)
- Modalidad óptica (resonancia de plasmones superficiales - SPRi)

En una realización preferente, el biosensor comprende:

- 20
- a) un elemento transductor (electroquímico o SPR),
 - b) una superficie de detección funcionalizada con un compuesto de fórmula (I),
 - c) un anticuerpo específico policlonal obtenido a partir del compuesto de fórmula (I),
 - d) e inmunoreactivos etiquetados con enzimas o de detección óptica, según el caso.

25 En este biosensor se coloca la muestra de interés, de forma que permite detectar y cuantificar la presencia de antibiótico de tipo colistina.

El compuesto de fórmula (I) podría ser, por ejemplo, un conjugado del antibiótico colistina unido a una proteína portadora (COL-EDC-BSA o COL-DMP-BSA).

30

El anticuerpo específico policlonal es el anticuerpo obtenido a partir del proceso de la presente invención donde se emplea el compuesto de fórmula (I) para inmunizar animales.

Los elementos principales de un biosensor óptico de tipo Resonancia de Plasmón Superficial (*Surface Plasmon Resonance*, por sus siglas en inglés -SPR) son:

- chip de oro (con frecuencia recubierto con dextrano o similar);
 - 5 - ligando inmovilizado (por ejemplo, un anticuerpo);
 - analito que se une al ligando (por ejemplo, colistina en plasma);
 - fuente de luz y sistema de detección (CCD o fotodetector);
 - flujo de muestra y sistema de regeneración.
- 10 Los biosensores propuestos representan una herramienta versátil y eficaz para el monitoreo terapéutico de colistina en pacientes con infecciones. Entre sus principales ventajas se destacan:
- alta sensibilidad comparable con técnicas como HPLC,
 - regeneración de la superficie sensora,
 - bajo costo operativo y portabilidad,
 - 15 • posibilidad de implementación en el punto de atención clínica (point-of-care).

Asimismo, constituye una solución innovadora para el control preciso de dosis en tratamientos personalizados, contribuyendo al uso racional de antibióticos y a la lucha contra la resistencia antimicrobiana.

- 20 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit para la detección y/o cuantificación del antibiótico colistina que comprende al menos un anticuerpo o un compuesto de fórmula (I) según se ha descrito anteriormente. Así mismo, el kit incluye recipientes para la(s) solución(es) que contiene(n) el (los) anticuerpos, también recipientes y/o soportes para colocar el
- 25 inmunorreactivo.

- Los componentes de este kit pueden estar unidos a distintos tipos de soportes conocidos en el estado de la técnica, tales como placas de poliestireno para ensayos ELISA o superficies sensoras de un biosensor. Asimismo, el kit también puede incluir otro tipo de componentes y reactivos
- 30 necesarios para llevar a cabo el análisis de la muestra problema.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del kit de detección descrito anteriormente para la determinación y/o cuantificación del antibiótico colistina en una muestra biológica aislada. Preferiblemente esta muestra biológica procede de origen humano y más preferiblemente son muestras de plasma sanguíneo. Esta muestra también puede ser no-biológica, por ejemplo, muestra de suelos, residuos, líquidos, plantas, microorganismos, alimentos, materia prima de cualquier origen y cualquier otro tipo de muestra.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. El uso de términos en singular o en plural se debe entender como intercambiables. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Ejemplos

A continuación, se ilustrará la invención mediante algunos ensayos realizados, que pone de manifiesto la especificidad y efectividad de los compuestos de fórmula (I) como haptenos e inmunoreactivos para la obtención de anticuerpos anti-colistina y desarrollo de inmunoensayos para la detección de antibióticos colistina.

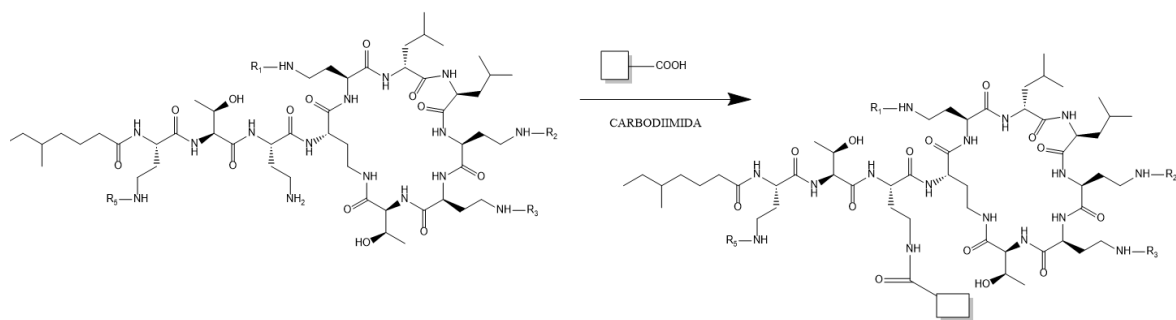
Ejemplo 1. Preparación de los inmunorreactivos

Los inmunoreactivos de fórmula (I) pueden ser preparados siguiendo distintos métodos conocidos para cualquier persona experta en el campo de la síntesis orgánica e inorgánica, en particular por los procedimientos generales que se presentan en los esquemas siguientes. Los materiales de partida para los métodos preparativos están disponibles comercialmente o bien se pueden preparar mediante métodos descritos en la literatura.

a) vía éster activo

En el caso de moléculas con grupos amina se conjugan con los soportes inmunogénicos usando la reacción de la carbodiimida o cualquier otro activador de la reactividad de ácidos carboxílicos, bien procedan de la molécula antibiótica del soporte inmunogénico (véase esquema 1).

Esquema 1



5

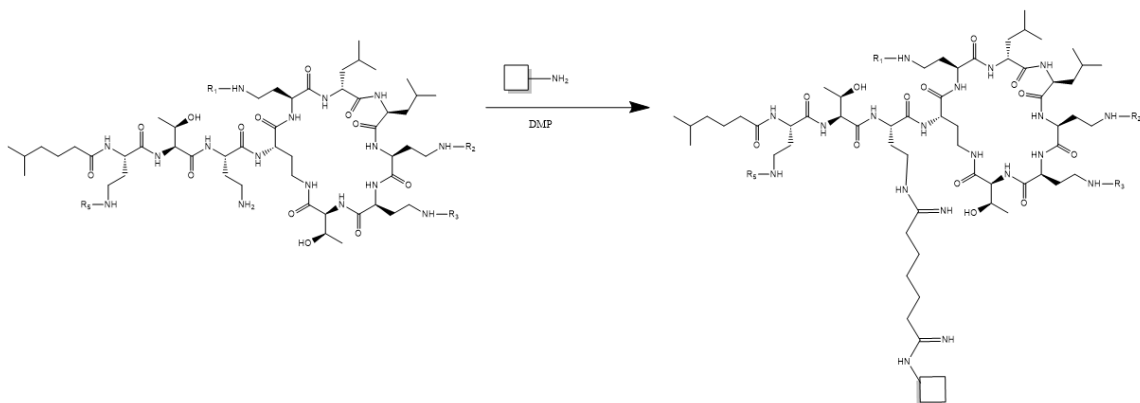
b) vía agente reticulador

En el caso de moléculas con grupos amina también se conjugan a los soportes inmunogénicos previamente funcionalizados a través de sus grupos amina usando un compuesto de unión homobifuncional. Dichos compuestos de unión homobifuncional pueden ser cloruro cianúrico, bis-Imidoésteres, bis-N-Succinimidil, diisocianatos o diisotiocianatos, biacilazidas, 5 dihaldehidos, dicetonas o cualquier compuesto susceptible de reaccionar con varios grupos amina por etapas (véase esquema 2).

10

15

Esquema 2



A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la especificidad y efectividad de los compuestos de fórmula (I) como

haptenos e inmunoreactivos para la obtención de anticuerpos anticolistina y desarrollo de inmunoensayos para la detección de dicho antibiótico.

Ejemplo 2. Ensayos de inmunoquímica

5

Procedimientos generales y equipos.

El MALDI-TOF-MS (espectrómetro de masas con detección por tiempo de vuelo, con ionización por desorción mediante láser asistida por matriz) usado para analizar los conjugados de proteína fue una Estación de Trabajo Perspective BioSpectrometry provista del software
10 Voyager-DE-RP (versión 4.03) desarrollado por Perspective Biosystems Inc. (Framingham, MA) y Grams/386 (para Microsoft Windows, versión 3.04, nivel III) desarrollado por Galactic Industries Corporation (Salem, NH).

Análisis de la densidad del hapteno.

15 Las densidades del hapteno de los conjugados de proteína se calcularon mediante MALDI-TOF-MS comparando el peso molecular de las proteínas naturales con el de los conjugados. Los experimentos de MALDI se realizaron mezclando 2 μ L de la matriz recientemente preparada (ácido trans-3,5-10 dimetoxi-4-hidroxycinnámico, 10 mg mL⁻¹ en ACN/H₂O 70:30, TFA al 0,1%) con 2 μ L de una disolución de los conjugados o las proteínas en ACN/H₂O 70:30, TFA
20 al 0.1% (5 mg mL⁻¹). Se calculó la densidad del hapteno según la siguiente ecuación:
$$[\text{PM}(\text{Conjugado}) - \text{PM}(\text{Proteína})] / \text{PM}(\text{Hapteno}).$$

Caracterización de los anticuerpos

El pH y la conductividad de todos los tampones y disoluciones se midieron con un pH metro
25 pH 540 GLP y un conductímetro LF 340, respectivamente (WTW, Weilheim, Alemania). Las placas de microvaloración de poliestireno se adquirieron de Nunc (Maxisorp, Roskilde, DK). Las etapas de lavado del ELISA se llevaron a cabo en un lavador de microplacas SLY96 PW (SLT 20 Labinstruments GmbH, Salzburg, Austria). Las absorbancias se leyeron en un SpectramaxPlus (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Las curvas de competencia se analizaron
30 con una ecuación logística de cuatro parámetros usando el software SoftmaxPro v2.6 (Molecular Devices) y GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

Mediciones mediante biosensores

Las mediciones amperométricas se realizaron con un equipo portátil Potenciostato μ STAT 200 (Dropsens, España). Electrodo de pantalla impresa de oro (Au/SPEs DRP-220AT, Dropsens, España) compuestos por un electrodo de trabajo de oro liso de 4 mm, un contraelectrodo de platino, un electrodo de referencia de Ag y contactos eléctricos de plata.

Las mediciones ópticas se realizaron con un biosensor OpenPlex. HORIBA Scientific SPR imaging. Francia. Se utilizaron chips de oro SPR sensor chips, 28.0 x 12.5 x 0.3 mm. Horiba OpenPlex and EzPlex compatible. Coating: 2D carboxymethyl dextran Surface. Para el control de instrumentos y análisis de datos se usó el software OpenPlex, Francia S.A.S. Francia, utilizando SPRi-View y SPRi-Analysis. Las curvas de calibración fueron ajustadas a una ecuación logística de cuatro parámetros usando el software Graph Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.) y Origin Lab 8.6 (Origin Lab Corporation).

Productos químicos e immunoquímicos.

Se obtuvieron los productos immunoquímicos de Sigma Chemical Co. (San. Luis, MO).

Preparación de soluciones tampón.

Disolución salina tamponada con fosfato (PBS) es tampón fosfato 0,01 M en una disolución salina al 0,8%, y el pH es 7,5. PBST es PBS con Tween 20 al 0,05%. Tampón borato es ácido bórico/borato de sodio 0,25 M pH=8.7. Tampón de tapizado es tampón carbonato-bicarbonato 0,05 M, pH 9,6. Tampón citrato es una disolución 0,04 M de citrato de sodio, pH 5.5. La disolución del sustrato contiene TMB al 0,01% (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) y H_2O_2 al 0,004% en tampón citrato.

Preparación de inmunoreactivos.

• Inmunorreactivo I

La haptenización de los soportes inmunogénicos para el caso de haptenos que poseen un grupo ácido o amina se realizó de la siguiente manera. Se añadió una disolución del antibiótico (10 μ mol) en PBS (100 μ L) a una disolución de la proteína (10 mg) en agua milliQ (1 mL) seguido por la adición de una disolución de EDC (50 μ mol) en agua (100 μ L) y se agitó la mezcla durante

3 horas a temperatura ambiente. Se purificaron los conjugados de las proteínas mediante diálisis frente a PBS 0,5 mM (4 x 5 l) y agua milliQ (1 x 5 l) y se liofilizaron.

Utilizando dicha metodología se preparó el siguiente inmunoreactivo: COL-EDC-BSA. Densidad de Hapteno (mol Hapteno/mol proteína): 14.

5

- Inmunorreactivo II

La haptenización de los soportes inmunogénicos en el caso de haptenos que poseen un grupo amino se realizaron de la siguiente manera. se prepararon dos soluciones: a. una solución de clorhidrato de dimetilpimelimidato (DMP 2HCl, 0,16 mg) en tampón borato 0,2 M (66 µL) y b. solución de antimicrobiano (0,33 mg) en agua ultrapura (100 µL) ambas en baño de hielo. A continuación, se mezclaron ambas disoluciones y dicha mezcla se añadió gota a gota a una solución de BSA (2 mg) en tampón de bórax/borato 0,2 M (500 µL) sumergida en hielo, manteniendo en agitación durante 10 min y 60 min a temperatura ambiente. La reacción se detuvo añadiendo base Tris (20 mM) en tampón de borato 0,2 M (134 µL).

15

Se purificaron los conjugados de las proteínas mediante diálisis frente a PBS 0,5 mM (4 x 5 l) y agua milliQ (1 x 5 l) y se liofilizaron.

Utilizando dicha metodología se preparó el siguiente inmunoreactivo: COL-DMP-BSA. Densidad de Hapteno (mol Hapteno/mol proteína): 4.8.

20

Preparación de antisueros policlonales.

Se llevó a cabo el protocolo de inmunización en hembras de conejos blancos New Zealand que pesaban 1-2 kg, según se ha descrito anteriormente (Salvador, *Analytical Chemistry*, 2007, 79, 3734-3740). Los inmunógenos (100 µg) disueltos en PBS (0.5 mL) fueron emulsionados con adyuvante de Freund, completo la primera vez e incompleto el resto, en una relación 1:1. Inmediatamente fueron inyectados de manera intradérmica en diferentes lugares de la espalda del animal huésped (una inyección al mes). Se evaluó la evolución de los títulos del anticuerpo midiendo la unión de las diluciones en serie de los diferentes antisueros en placas recubiertas con el correspondiente inmunoreactivo. Después de observarse un título aceptable de anticuerpos, se desangraron los animales y se recogió la sangre en tubos vacutainer provistos de un gel de separación del suero. Se obtuvieron los antisueros mediante centrifugación y se almacenaron a -80 °C.

30

Ejemplo 3. Desarrollo de ELISAs competitivos indirectos para colistina

La avidéz de los antisueros (EDC) y los bioconjugados heterólogos BSA (DMP) se evaluó mediante ensayos de titulación unidimensionales. Como se observa en la Figura 1, el título de los anticuerpos obtenidos aumenta a medida que avanza el proceso de inmunización.

Las combinaciones óptimas de inmunorreactivos se evaluaron en un ensayo de competencia indirecta por su capacidad para reconocer su antibiótico analito correspondiente (Figura 2).

10

Las placas se recubrieron con el correspondiente antígeno de tapizado (formato indirecto) o antisuero (formato directo) disuelto en tampón de de tapizado (100 µL/pocillo) durante toda la noche a 4°C o 4 horas a temperatura ambiente y se cubrieron con placas adhesivas herméticas. Posteriormente, se lavaron las placas con PBST (cuatro veces, 300 µL/pocillo) y se añadieron los patrones de colistina (0.01 nM - 10000 nM, en PBST, 50 30 µL/pocillo) seguidos por el correspondiente antisuero (formato indirecto) o trazador enzimático (formato directo) (50 µL/pocillo) a las placas.

20

Después de 30 min a temperatura ambiente, se lavaron las placas como se ha descrito anteriormente y para el caso del formato indirecto se añadió una disolución de IgG antiIgG de conejo marcada con HRP (1/6000 en PBST) (100 µL/pocillo) y se incubaron durante 30 min más a temperatura ambiente. Se lavaron las placas de nuevo, y para ambos formatos se añadió la disolución del sustrato (100 µL/pocillo). Se detuvo el desarrollo del color después de 30 min a temperatura ambiente con 4N H₂SO₄ (50 µL/pocillo), y se leyó la absorbancia a 450 nm. Las curvas patrón se ajustaron a una ecuación de cuatro parámetros según la siguiente fórmula: $Y = [(A - B) / (1 + (x/C)^D)] + B$, en la que A es la absorbancia máxima, B es la absorbancia mínima, C es la concentración que produce el 50% de la absorbancia máxima, y D es la tangente en el punto de inflexión de la curva sigmoidea.

25

Los dos antisueros se obtuvieron mediante inmunización con el compuesto de formula (I) COL-EDC-HCH, es decir, colistina unida a la proteína HCH por el método de éster activo. En los dos casos el ELISA muestra IC₅₀ inferiores a 10 nM y LOD inferiores a 0,005 nM, lo que

30

demuestra que los anticuerpos obtenidos son específicos para colistina y son capaces de detectarla a concentraciones muy bajas.

De esta manera se obtuvieron los siguientes ELISAs competitivos para colistina:

5

Antisuero	Abs max	Abs min	IC ₅₀ (nM)	Pendiente	LOD (nM)
Rb66	0,69	-0,00	7,56	-0,11	0.003
Rb67	1,77	0,66	8,75	-0,19	0.002

Tabla 1: Parámetros de ensayos ELISA competitivo para la detección de colistina utilizando inmunoreactivos y anticuerpos desarrollados con los inmunoreactivos descritos en la presente invención.

10

Ejemplo 4. Desarrollo de un biosensor electroquímico para la medición indirecta de colistina

Los amperogramas se adquirieron a un potencial aplicado de -0.10 V vs. el electrodo de referencia de Ag durante 60 s. Las señales se adquirieron en la tasa de flujo descrita anteriormente. La señal registrada fue el valor medio de la corriente obtenida en los últimos 20 s cuando se alcanzó el estado estacionario. La diferencia entre la señal obtenida cuando la solución de sustrato (S) es añadida y la señal registrada con el tampón citrato (C) se consideró la señal específica producida por el antiIgG unido al bioconjugado. Las curvas estándar se ajustaron a una ecuación de cuatro parámetros, siguiendo las guías ICH para metodologías analíticas.

20

De esta manera se obtuvieron las siguientes mediciones para colistina:

Antibiótico	Imin	Imax	Pendiente	IC ₅₀ suero diluido(nM)	IC ₅₀ real (nM)	LOD suero diluido (nM)	LOD real (nM)
COL	0.2629	0.859	-1.508	4.71	47.11	0.18	18

Tabla 2: Parámetros de los ensayos con biosensor electroquímico para la detección de colistina utilizando inmunorreactivos y anticuerpos desarrollados con los inmunoreactivos descritos en la presente invención.

25

Se obtuvieron valores de IC_{50} para muestra sin diluir inferiores a 40 nM y LOD de muestra sin diluir inferior a 20 nM, lo que demuestra que en el formato de biosensor electroquímico los anticuerpos son capaces de cuantificar la colistina a concentraciones bajas dentro de los rangos adecuados para el monitoreo terapéutico de pacientes.

Ejemplo 5. Desarrollo de un biosensor óptico para la medición directa de colistina

Al igual que las curvas de calibración realizadas para el biosensor electroquímico se siguieron las guías ICH para metodologías analíticas. La curva de calibración se realizó enriqueciendo el plasma con cada uno de los antibióticos. Para llevar a cabo el enriquecimiento se realizaron diluciones seriadas a cada antibiótico en un rango de concentración entre 500 y 10000 ng/mL utilizando buffer de PBS 0.01M pH 7.4.

Posteriormente, cada una de las diluciones fue inyectada de manera individual sobre la superficie sensora correspondiente a colistina. El volumen de inyección de 200 μ L en un flujo de 50 μ L/min. El resultado obtenido de la unión entre el anticuerpo y el analito fue tomado en el punto máximo de la asociación de los sensogramas 10 s después de la inyección. Después de cada medición en los ensayos de unión (Ag/Ac), se realizó la regeneración de la matriz, asegurando que entre cada medición el analito no interfiriera con las nuevas mediciones. Para ello, previamente fue elegido el agente de regeneración de acuerdo con protocolos reportados en la literatura basados en la naturaleza química del analito y el ligando. Después de los ensayos de regeneración, el agente escogido fue NaCl 0.5M

Antibiótico	LOD	LOQ
COL	9 ng/mL	21.3 ng/mL

Tabla 3: Resultados de límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) de los ensayos con biosensor electroquímico para la detección de colistina en plasma humano utilizando inmunorreactivos y anticuerpos desarrollados con los inmunorreactivos de la invención.

El biosensor SPRi obtuvo un límite de detección de 12 ng/mL y un límite de cuantificación de 25 ng/mL para colistina en plasma tratado. La regeneración de la superficie sensora se realizó con NaCl 0.5 M, permitiendo múltiples ciclos de análisis sin pérdida significativa de señal.

5 Referencias bibliográficas

Falagas, M. E., Kasiakou, S. K., & Saravolatz, L. D. (2005). Colistin: The revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clinical Infectious Diseases*, 40(9), 1333–1341.

10

Garzón, V., Salvador, J.-P., Marco, M.-P., G.-Pinacho, D., & Bustos, R.-H. (2024). Development and ELISA Characterization of Antibodies against the Colistin, Vancomycin, Daptomycin, and Meropenem: A Therapeutic Drug Monitoring Approach. *Antibiotics*, 13(7), 600.

15

Inna A. Galvidisa, Sergei A. Ereminb and Maksim A. Burkin. (2020). Development of indirect competitive enzyme-linked immunoassay of colistin for milk and egg analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(5), 1234–1242.

20

Nation, R. L., & Li, J. (2009). Colistin in the 21st century. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 22(6), 535–543. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e328332e672>

25

Poirel, L., Jayol, A., & Nordmann, P. (2017). Polymyxins: Antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. *Clinical Microbiology Reviews*, 30(2), 557–596. <https://doi.org/10.1128/CMR.00064-16>

30

Liu, Y.-Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L.-X., Zhang, R., Spencer, J., ... & Shen, J. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(2), 161–168. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7).